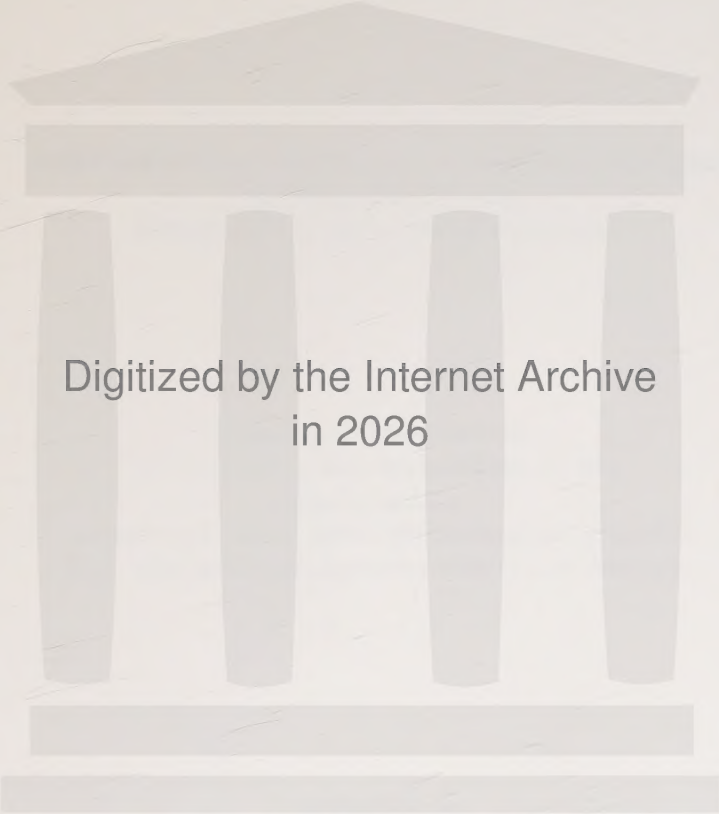


**MOLEKULARGEWICHTSSCHÄTZUNGEN VON
HERZMUSKELPROTEINEN BEIM MENSCHEN MIT
DER DÜNN SCHICHT-GEL-CHROMATOGRAPHIE**

Christel Nobis-Dähnke

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0095

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. N. Zöllner

MOLEKULARGEWICHTSSCHÄTZUNGEN VON HERZMUSKELPROTEINEN
BEIM MENSCHEN MIT DER
DÜNNSCHICHT - GEL - CHROMATOGRAPHIE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der
Zahnheilkunde
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christel Nobis - Dähnke
aus
Quakenbrück
1974



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Nowy
Mithberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1974

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

METHODIK

A GELAUFBEREITUNG

a. Material

b. Handhabung des Gels

B VERSUCHSABLAUF

C VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

D MYOCARDEXTRAKTHERSTELLUNG

a. Forderungen an das Untersuchungsmaterial

b. Bearbeitung des Untersuchungsmaterials

c. Gewinnung der Fraktionen

ERGEBNISSE

a. Eichung

b. Molekulargewichtsschätzungen

DISKUSSION

A DISKUSSION DER METHODIK

a. Aufbereitung des Materials

b. Versuchsdurchführung

c. Proteinverhalten im Versuch

B DISKUSSION DER ERGEBNISSE

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATURVERZEICHNIS

EINLEITUNG

Während ihrer Experimente, vor etwa 15 Jahren, haben LATHE und RUTHVEN (24) eine Beziehung zwischen dem Molekulargewicht und dem Elutionsvolumen bei Polysacchariden und Polypeptiden herausgefunden. Nach der Einführung von gekreuzt verkettetem Dextran Gel (Sephadex) von RORATH und FLODIN (38), richtete sich das Interesse hauptsächlich auf die Isolation und Reinigung von Macromolekülen, durch die sogenannte Gelfiltration. Wegen der sehr großen und komplizierten Anlagen für die konventionelle Methode der Molekulargewichtsbestimmung von Macromolekülen, versuchte man sehr bald für die neue Methode, das Elutionsvermögen und das Molekulargewicht quantitativ in Verbindung zu bringen.

LAURENT und KILLANDER (25) haben dann ein einfaches physikalisches Modell für das Gelnetzwerk entworfen; sie nahmen an, daß die Dextranketten gerade, unendlich lange Ketten mit dem Radius r_T sind, die auf's Geratewohl im Gel verteilt sind und gebrauchen OSTONS Angleichung. Die Standardkurven, die sich aus diesem System ableiten, sind aber nicht linear.

ACKERS (1) behauptet, daß der Mechanismus der Gelchromatographie mit Sephadex G 200 oder auch mit Agarose anders ist, als der der anderen bekannten und gebräuchlichen Gele. Für Sephadex G 200 basiert der Diffusionsmechanismus auf einem Modell, bei dem die Flüssigkeitsregionen in den Gelpartikeln durch uniforme zylindrische Kanäle dargestellt werden. Er bezieht sich bei dem Radius solcher Poren auf die Stoke'schen Radii von Macromolekülen.

Eine Proportionalität zwischen dem Elutionsvolumen und dem Logarithmus des Molekulargewichtes bei globulären Proteinen ist von mindestens zwei Dutzend verschiedener Autoren, die Sephadex benutzt haben, empirisch ermittelt worden, obwohl rein rechnerisch keine Beziehung darzustellen ist. Um eine Eichkurve herzustellen, muß man einfach das Elutionsvolumen von einigen gut bekannten Proteinen messen. DETERMANN und MICHEL (15) halten es für unbefriedigend, das keines der bis jetzt bestehenden Denkmö-delle für den Prozeß der Gelchromatographie mit diesen empirisch ermittelten Beziehungen übereinstimmt.

Wir sollten nun mit dieser Arbeit versuchen, durch die Dünnschicht - Gelchromatographie eine Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen des Menschenherzens zu erreichen.

METHODIK

A GELAUFBEREITUNG

a. Material

Zur Dünnschicht - Gel - Chromatographie (DETERMANN H. 12), einer Chromatographie auf Schichten gequollener Molekularsiebe, benutzten wir Sephadex G - 200 superfine (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Schweden). Es ist ein stark hydrophiles Gel, ein modifiziertes Polysaccharid in Perlform mit einem Perlendurchmesser von 10 - 40 μ , einem Aufnahmevermögen von 20,0 ml /g ($\pm$ 2,0 ml /g) Wasser. Es läßt sich ebenso auch in organischen Flüssigkeiten und einer Mischung aus Wasser und niederen Alkoholen quellen, und hält auch schwachen Säuren einige Stunden lang stand.

Im Gegensatz zu den früher gebräuchlichen Dünnschicht - materialien besitzt dieses Gel kein Ansaugvermögen für das Elutionsmittel und es muß deshalb absteigend, bei einem Neigungswinkel von 15 bis 30° chromatographiert werden.

Die Bestandteile der Probe bleiben je nach Molekülgröße und -form in den Hohlräumen der Raumnetzstruktur des Gels hängen. Dadurch resultiert eine verschieden große Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle.

Moleküle die oberhalb der Ausschlußgrenze des Gels liegen, dringen nicht in die Gelperlen ein, werden also nicht retiniert und wandern besonders schnell durch die Gelschicht durch. Das Gelvolumen des Sephadex G 200 umgerechnet auf das trockene Sephadex liegt bei 30 - 40 ml/g. Der Fraktionierungsbereich für Peptide und globuläre Proteine umfaßt 50 000 - 800 000 Mol.gew.

Als Elutionsmittel benutzten wir Tris - EDTA - Borsäure - Puffer mit einem pH von 8,9.

Zusammensetzung: Tris	605,0 g
EDTA	60,0 g
Borsäure	46,0 g
aqua dest	ad 10,0 l

in folgender Verdünnung: 1 + 2,5 Teile aqua dest.

b. Handhabung des Gels

Zur Herstellung des Gels gibt es zwei Arten der Aufbereitung. Wir haben 10 g Sephadex G 200 superfine in 1000 ml aqua dest aufgeschwemmt und dann entweder 5 - 6 Stunden im Wasserbad unter gelegentlichem Umrühren zum Sieden gebracht oder bei Raumtemperatur 2 - 3 Tage unter langsamen Rühren quellen lassen. Danach läßt man sich das gequollene Gel absetzen, mindestens über Nacht, und entfernt den Überstand an aqua dest durch Dekantieren oder Abhebern.

Nun muß das Gel mit dem Tris - EDTA - Borsäure - Puffer in der angegebenen Verdünnung 3 - 4 Mal durchgespült werden. Das fertige Gel wird in kleineren Portionen in Gläser gefüllt, mit Parafilm verschlossen und ca. eine Woche im Kühlschrank vor dem Weiterverarbeiten gelagert, wobei der Überschuß an Pufferlösung über dem sich absetzenden Gel beibehalten wird.

Wird das Gel längere Zeit nicht gebraucht, empfiehlt es sich, das Gel mittels Alkohol und anschließendem Trocknen bei 60 - 80° C wieder in den Trockenzustand zurückzubringen oder es mit 0,02% NaN_2 (Natriumacid) gegen mikrobielles Wachstum zu schützen.

Vor dem Auftragen auf die Platten muß der Überschuß an

Pufferlösung abdekantiert werden. Ebenso sollte das Gel evakuiert werden, um der Entstehung von Luftblasen vorzubeugen, die zu einem ungleichmäßigen Durchfluß oder einem Abriß der Gelschicht führen können. Von dem evakuierten Gel wurde mit einem Spatel eine kleine Probe entnommen und dünn auf eine gesäuberte Platte aufgetragen. Hielt man die Platte nun schräg, durfte das Gel nicht herunterlaufen. War dies der Fall, so mußte das Gel noch über einen Faltenfilter filtriert bzw. länger abdekantiert werden, riß dagegen die Gelschicht beim Auftragen ab, so war das Gel zu trocken und mußte mit Elutionsmittel oder dünnem Gelbrei verdünnt werden.

B VERSUCHSABLAUF

In den letzten Jahren hat sich die Dünnschicht-Technik in der Chromatographie recht rasch eingebürgert, besonders in den Fällen, wo nur geringe Probemengen zur Verfügung standen (DETERMANⁿ H. 12)

Sie läßt sich auch leicht mit der Elektrophorese (HANSON L.A., JOHANSSON B.G., RYMO L., 18,19) oder Immunodiffusion kombinieren (CANNEGIE P.R. u. PACHEO G., 10)(GRANT G.H. u. EVERALL J., 17). Bisher hat man sie meist zur Trennung von Proteinen benutzt, wir wollen sie jetzt aber zur Molekulargewichtsschätzung heranziehen.

Wir verwendeten das Chromatographiegerät der Firma Boehringer Mannheim (Abb. 1).

Der wichtigste Bestandteil ist die Sandwichkammer, die auf einem Kammerträger (b) aufliegt, der am Ende einen Dorn

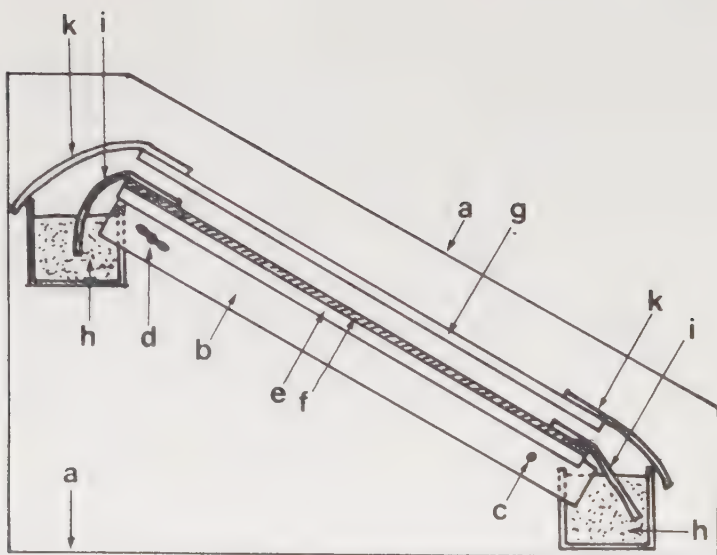


Abb. 1

Experimentelle Anordnung bei der Dünnschicht - Gelfiltration
(seitliche Ansicht)

- a. Seitliche Wand
- b. Kammerträger
- c. Drehpunkt für Kammerträger
- d. Flügelschraube zum Verstellen des Winkels des
Kammerträgers
- e. Glasplatte
- f. Gelschicht
- g. Deckplatte
- h. Behälter für Elutionsmittel
- i. Filterpapier
- k. Parafilm

hat und damit die Glasplatten am Abrutschen hindert.

Die Träger sind beweglich in dem Punkt c, mit ihnen läßt sich die Winkелеinstellung der Platte beliebig ändern und mit der Schraube (d) läßt sich diese Einstellung dann fixieren, ebenso ist es möglich, die Winkелеinstellung mit dieser Schraube während des Versuches zu verändern.

In den beiden Kammerträgern hängt jeweils oben und unten ein Elutionsmitteltrog (h). Der Abstand der Seitenwände ist beliebig zu variieren; da wir Chromatographieplatten von dem Format 20 x 20 cm gebrauchten, stellten wir den Abstand auf 20,5 cm ein.

Im Laufe der Vorversuche stellte sich heraus, daß wir die Winkелеinstellung während eines Versuchsablaufes nicht zu ändern brauchten. So bauten wir jetzt noch sieben solcher Arbeitsgeräte, bei denen sich die Winkелеinstellung aber nur jeweils um 5° von 0° bis 30° ändern ließ.

Diese Chromatographiegeräte haben wir auf einer mit der Wasserwaage ausgerichteten Glasplatte aufgebaut und weiter mit der Wasserwaage geprüft, ob die Kammerträger auf gleicher Höhe waren, und somit den gleichen Winkel besaßen, damit uns nicht die Proteine auf einer seitlich geneigten Glasplatte diagonal abwandern würden.

Nach dem Füllen der Elutionsmittelbehälter haben wir noch einmal den Abstand zwischen Glasplatte und der Oberfläche des Elutionsmittels gemessen und diesen Abstand bei all unseren Versuchen eingehalten, um später eine gleichmäßige Wanderung des Bezugsproteins pro Stunde zu erhalten.

Eine weitere Bedingung war, daß die Chromatographienplatten in sich keine Verwindung zeigen durften.

Um die beschichteten Gelplatten vor dem Austrocknen während des Versuchsablaufes zu schützen, brachten JOHANSSON,

RYMO L. und MORRIS (22,31) die Chromatographieplatten in eine feuchte Kammer. Im Verlaufe der anschließenden Versuche stellte sich jedoch heraus, daß die Dimensionen dieser Kammer zu groß gewählt waren, ein Teil des Ablaufmittels verdampfte auf der Platte und es kam dadurch in der Gelschicht zu Konzentrations- und Komponentenveränderungen. DETERMANN und MICHEL (14) hatten dann die Idee, diese einfache Kammer durch eine sogenannte Sandwichkammer zu ersetzen. Dabei legten sie auf die Platte mit der Gelschicht an den Langsseiten Kartonstreifen, die die zweite Platte in einem gleichmäßigen geringen Abstand zur ersten hielt. Durch Klammern mußten diese Platten zusammengepreßt werden, damit sie beim Neigen gegen die Horizontale nicht abrutschten. Durch dieses einfache Verfahren, trocknete die Gelschicht nicht ungleichmäßig aus und auch die Ablaufzeiten verkürzten sich.

Dieses System hatte jedoch auch seine Mängel, diese zeigten sich besonders daran, daß die Streifen nicht sehr gut abdichteten, dazu saugten sie sich leicht mit Elutionsmittel voll, wodurch ein ganz erheblicher Randeffect, einmal durchs Austrocknen, zum anderen durch Seitlichwandern der Proteine zu Tage trat. Um das Austrocknen zu vermeiden, mußte die Klammer sehr fest sitzen, dadurch kam es beim Zusammendrücken bzw Entfernen der oberen Platte zur Verschiebung der Kartonstreifen und damit zur Verletzung der Gelschicht. Wir verwendeten Silikonschläuche, die wir längs aufschlitzten und über die Seitenkanten der Deckplatte zogen. Durch verschiedene Schlauchdicken läßt sich der Abstand der Platten ändern. Außerdem wird dadurch das Kammer-system besser abgedichtet, es kann keine Feuchtigkeit mehr verdampfen und das Elutionsmittel gleichmäßig herunterlaufen. Klammern sind auch keine mehr nötig, denn die Plat-

ten haften bis zu einem Winkel von 75° fest aneinander, und dadurch, daß die Schläuche keine Feuchtigkeit aufnehmen, kann der Randeffect sehr gering gehalten werden.

Die Platten zur Dünnschicht - Gelchromatographie müssen peinlichst sauber und staubfrei sein, da sonst das Gel nicht haftet bzw. der Ablauf der Proben gestört wird. Wir haben die Chromatographieplatten mit einer Haemosol-Lösung in der vorgeschriebenen Verdünnung gewaschen, wobei den Rändern ganz besondere Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Danach haben wir sie zuerst unter laufendem warmen Wasser gespült und anschließend mit reichlich aqua dest abgespritzt. Abetroknet haben wir die Platten dann mit Zellstoff, wobei keine Rückstände auf den Platten bleiben durften. Jetzt waren sie bereit, mit Gel beschichtet werden zu können.

Als Ergänzung zum Chromatographiegerät hat die Firma Boehringer Mannheim ein Gelstreichgerät herausgebracht, daß speziell für das Auftragen von Sephadex-Gel angefertigt wurde. Der Abstand zwischen Platte und Austrittsöffnung beträgt 0,5 mm. Nun wird das gefüllte Gerät auf der Platte hin und her geschoben. Ist die Schicht an einigen Stellen nicht gleichmäßig oder abgerissen, so kann durch vorsichtiges Ausbessern mit Hilfe des Gerätes die Gelschicht vervollständigt werden. Insgesamt dürfen auf der Gelschicht keine Querstreifen auftreten. Das Gerät läßt sich während des Bestreichens jederzeit von oben her gleichmäßig über die ganze Breite der Glasplatte füllen.

Wir haben am Anfang versucht, die Platten bereits am Tage vor dem Versuchsablauf zu beschichten und über Nacht in einer feuchten Kammer aufzubewahren. Die Erfahrung zeigte aber, daß sie sehr stark am Rande austrocknen und damit einen starken Randeffect zeigten. So gingen wir dazu über,

die Platten erst wenige Minuten vor Gebrauch zu beschichten und dann horizontal und kurz offen zu lagern, um dadurch zusätzlich eine gleichmäßige Schichtdicke zu erlangen.

Zum Auftragen der Proteine nach dem Beschichten der Platten mit Gel, schienen uns alle in der Literatur angegebenen Vorschläge zu vage und ungenau. Darum entwickelten wir ein Hilfsgerät, das uns zum Auftragen genauso dient, wie zum Wiederauffinden der Auftragestellen nach dem Versuchsablauf.

Die mit Gel beschichtete Glasplatte liegt auf einer größeren Grundplatte, die oben und an den Seiten begrenzt ist, so daß die Gelplatte gerade hereingeschoben werden und in einer Ecke fixiert werden kann. Am oberen Teil der Platte ist eine Doppelbrücke angebracht, die genau soweit über unsere beschichtete Gelplatte hinüberreicht, wie wir die Auftragestellen aufs Gel legen wollen, etwa 3 cm vom oberen Rand der Glasplatte entfernt. Diese Brücke hat fest eingeschliffene Führungsrillen für die Mikrospritze, 3 cm von der seitlichen Begrenzung der Glasplatte und einer Entfernung von 1 - 2 cm untereinander. Die Mikrospritze kann somit beim Auftragen in die Führungsrinne eingelegt und mit dem Finger gegen ein Herausrutschen gesichert werden. Es werden etwa 1 - 3 μ l aufpipettiert, die dann auf dem Gel einen Durchmesser von 4 - 5 mm ergeben sollten. Dabei ist auf eine möglichst hohe Konzentration der Proben zu achten. Beim Auftragen darf die Gelschicht durch die Nadel nicht verletzt werden.

Beim Auftragen der Eichproteine wählten wir selbst eine Konzentration von 20 - 50 μ g auf 2 - 5 μ l. Sollen zwei oder mehrere Proteine über eine Ablaufstrecke gleichzeitig laufen, zur gleichzeitigen Trennung und Molekulargewichtsstimmung, so ist möglichst eine gleiche Konzentration von

allen beteiligten Komponenten anzustreben, da sonst Fehler in der Auswertung auftreten. Die dann ermittelten Molekulargewichte entsprechen nicht dem Molekulargewicht, das sich durch Einzelablauf ergeben hätte. Das trifft auch dann zu, wenn man zum besseren Sichtbarmachen und zum Ausgleich einer möglichen uneinheitlichen Gelschicht jeder unbekannten Proteinprobe vor dem Auftragen zu 50% (Volumen %) Myoglobin zusetzt.

Bessere Ergebnisse haben wir ermittelt, wenn wir ein ums andere Mal Myoglobin und das zu testende Protein auf die Platte aufgetragen haben, so daß jeweils ein Testprotein zwischen zwei Myoglobinabläufen lag.

C VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Zu Beginn des Versuches werden die Elutionsmittelbehälter mit Tris - EDTA - Borsaure - Puffer bis zur vorher ausgemessenen Höhe gefüllt. Dann werden die vorbereiteten Filterpapierstreifen (MACHEREY und NAGEL 212) der Größe 5 x 19,5 cm in der Breite im Verhältnis 2:3 gefaltet. Jetzt wird die beschichtete Gelplatte eingelegt und zur gleichen Zeit von einem Helfer, die Filterpapierstreifen, die in einem Tris - EDTA - Borsaure - Puffer - Bad gelegen haben herausgenommen, abgetropft und vorsichtig in Fließpapier ausgetrichen. Am Anfang und Ende der Platte wird je ein Streifen blasenfrei aufgelegt. Am einfachsten ging es, wenn man zunächst die 3 cm breite Seite in den Elutionsmitteltrog einhing, wobei der Knick die Plattenkante berührte, und dann die 2 cm des Filterpapierstreifens vorsichtig auf die Gel-

schicht aufbrachten, ohne sie dabei zu verletzen.

Diese Gelplatte wurde jetzt mit einer zweiten Platte gleicher Größe abgedeckt, aber diese Deckplatte war an den Seiten mit den aufgeschlitzten Silikonschläuchen versehen und hatte oben sowie unten einen Streifen Parafilm angeklebt, der dann über den Behälter mit dem Elutionsmittel gelegt wurde und die Filterpapierstreifen vor dem Austrocknen bewahrte und die feuchte Kammer vervollständigte.

Ein Versuchsablauf bei einem Neigungswinkel von 30° dauerte etwa 3 - 4 Stunden. Nach einer Wanderung des Myoglobins von 5 - 6 cm bei richtig bereiteten Gelplatten, konnte der Ablauf gestoppt werden. Die Parafilmstreifen wurden auf die Platten umgeschlagen und der untere Filterpapierstreifen vorsichtig herausgezogen, dann konnte mit Hilfe der Parafilmstreifen die Deckplatte leicht abgehoben werden, dabei war lediglich darauf zu achten, daß der obere Filterpapierstreifen nicht berührt wurde oder sich Elutionsmittel am Parafilm gesammelt hatte, da es sonst zu einer Beschädigung der Gelschicht kam. Nun konnte die Gelplatte abgenommen werden und in horizontale Lage gebracht, wurde der obere Filterpapierstreifen ebenfalls entfernt.

Die Gelplatte mit den Abläufen wurde in eine Ecke der Grundplatte des Auftragegerätes fest eingelegt und vorsichtig ein Filterpapier (FACHERY und NAGEL 212) der Größe 20 X 21 cm auf Stoß und blasenfrei auf die Platte aufgebracht.

Nun wurde die Platte wieder wie zu Beginn des Versuches unter die Doppelbrücke geschoben, fest angedrückt und mit der Mikrospritze kleine Löcher in das Filterpapier gebohrt, dort wo zu Beginn des Versuches das Protein aufgetragen worden war. Anschließend wurden diese Löcher mit einem wei-

chen Bleistift markiert.

Dann konnte das Papier von der Platte abgezogen werden und in horizontaler Lage, mit der Gelschicht nach oben unter einem Fön getrocknet werden. Erst wenn das Papier durch und durch trocken war, wurde es angefärbt, indem man den Papierabklatsch etwa 10 min in Amidoschwarzlösung legte und anschließend gut mit Leitungswasser spülte.

Zusammensetzung der Amidoschwarzlösung:

Amidoschwarz	0,5 g
Athanol	400,0 ml
Eisessig	100,0 ml
aqua dest	500,0 ml

Danach kann das Papier mit Elphorentfarber weiter entfärbt werden.

Zusammensetzung:

Methanol	200,0 ml
Eisessig	100,0 ml

Hat es darin einige Zeit gelegen, wird es erneut mit Wasser kräftig gespült, dabei darf das Wasser nie direkt auf den Papierabklatsch gebracht werden. Das Entfärben wird etwa 2 - 3 Mal durchgeführt und dann das Papier zum Trocknen aufgehängt.

Die Abklatsche der Proteinabläufe zeigen nach dem Färben mehr oder weniger dunkelblaue Flecken, die oftmals noch einen Schweiß besitzen oder am unteren Teil des Fleckens stärker gefärbt sind. Diese Flecken wurden mit einem weichen Bleistift umrandet und die Mitte ausgemessen.

Die Wanderungstrecke der Proteine wurde auf Myoglobin bezogen. Diese $R_{f, \text{Myo}}$ -Werte wurden gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes der Eichproteine aufgetragen. Bei späteren Versuchen mit unbekannten Proteinen kann man so

mit Hilfe der R_{Lyo} -Werte die Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine sofort finden.

Die Abbildung 2 zeigt A als Auftragestelle für Myoglobin und B als Auftragestelle des zu testenden Proteins. Myoglobin ist als kreisrunder deutlich gefärbter Fleck nach dem Ablauf zu erkennen, er hat zwar einen Schweif, der aber wesentlich weniger stark gefärbt erscheint.

Die Testfraktion, die in diesem Fall E_1 von M_1 ist, zeigt deutlich einen stärker eingefärbten Flecken, der jeweils zwei nebeneinander liegende Schweife nach sich zieht, die wiederum weniger stark gefärbt sind.

Auch einige Eichenproteine zeigen ein ähnliches Bild wie E_1 . Der Schweif deutet auf ein nicht ganz reines Protein hin. Hierbei verhielten wir uns so, daß wir nur den am stärksten gefärbten Teil umkreisten und zur Auswertung heranzogen.



Abb. 2

Ablauf zur Ermittlung der Fraktion E₁ Mensch

A = Myoglobin

B = Fraktion E₁

Die Zahlen geben die Länge des Ablaufs in cm an.

D. MYOCARDEXTRAKTHERSTELLUNG

a. Forderungen an das Untersuchungsmaterial

Für unsere Untersuchungen standen uns zwei Menschenherzen zur Verfügung. Diese Organe durften keinerlei pathologische Veränderungen aufweisen; denn nur durch gesunde Organe können allgemein gültige Aussagen über Herzmuskelproteine gemacht werden. Somit war eine postmortale Autolyse oder bakterielle Zersetzung möglichst gering zu halten oder zu vermeiden. Ebenso mußten Organe mit möglicher seniler Organatrophie ausgeschieden werden, darum durften die Organspender eine bestimmte Altersgrenze nicht überschritten haben. Außerdem war sicher zu stellen, daß Krankheiten, besonders Herzmuskelkrankheiten und gewebezestörende Prozesse, sowie Verriftungen, Starkstromschäden u.a. nicht zum Tode des Donators geführt hatten. Auch der Zeitpunkt zwischen Todeseintritt und Sektion spielt eine große Rolle, er sollte möglichst kurz gehalten werden.

Als Organspender kamen somit nur Personen in Betracht, die durch äußere Gewalteinwirkung zu Tode gekommen waren. Diese Organe wurden uns freundlicherweise vom Gerichtsmedizinischen Institut der Universität zur Verfügung gestellt.

Von den beiden Menschenherzen erhielten wir zwei verschiedene Extrakte, die mit H_1 und H_2 bezeichnet wurden.

M₁ :

männlich, 25 Jahre, (Nr. 477/70)

wurde am 6.9.70, 21.30 Uhr durch Messerstich in li. Atrium
getötet, Herzbeutel-tamponade

23.30 Uhr Einlieferung in Kühlraum des ge-
richt. med. Institut, Lagerung bei 3° C
bis

7.9.70, 14.00 Uhr Sektion. Sofortige Entnahme des
Herzens und Lagerung im Tiefkühlraum bei
-30° C.

M₂ :

weiblich, 26 Jahre, (Nr. 651/70)

Nachts vom 26.11. auf

27.11.70 Tod durch Halsschnitt und zahlreiche
Messerstiche, Verbluten.

27.11.70 6.00 Uhr Einlieferung in Kühlraum des
gericht. med. Instituts, Lagerung bei
3° C bis

8.00 Uhr Sektion. Sofortige Entnahme
des Herzens und Lagerung im Tiefkühl-
raum bei -30° C.

Bereits wenige Stunden nach der Sektion wurden die Or-
gane bis zur weiteren Verarbeitung in Trockeneis gelagert.

b. Bearbeitung des Untersuchungsmaterials

Nachdem das Herz im Kühlschrank aufgetaut wurde, wuschen wir es mit auf 0°C gekühlter, physiologischer Kochsalzlösung gründlich ab. Anschließend durchspülten wir die Koronargefäße mit derselben Lösung unter einem Druck von 150 cm Wassersäule solange, bis aus dem venösen Schenkel klare Flüssigkeit abfloß. Dann präparierten wir den Gefäßstamm, Bindegewebe und Fett ab und trennten Atrium und Ventrikel in der Ventilebene. Die Teile wurden gewogen, zerkleinert und das Myocard mit der doppelten Gewichtsmenge aqua bidestillata im Eisbad bei 0°C homogenisiert (Homogenisator E. Bühler, Tübingen, 7000 U/min). Alle Arbeitsvorgänge wurden stets auf eisgekühlter Unterlage ausgeführt, damit eine Erwärmung des Materials vermieden wurde.

Das Homogenat wurde zur Gewinnung eines Auszuges 18 Std. im Eisschrank bei 2°C gerührt und anschließend bei 30 000 U/min und 0°C zweieinhalb Stunden ultrazentrifugiert. (Beckmann Ultrazentrifuge L2, Rotor 30, mittlere Beschleunigung: 78 500 g)

Das Sediment verwarfen wir und den Überstand, einen klaren rotbraunen Extrakt, prüften wir mit der Biuretmethode auf den Gesamteiweißgehalt. Für den Ventrikelextrakt ergab sich: ca. 1g/100ml.

Zur weiteren Ultrafiltration verwendeten wir die Ultrafilter 6 $\times$ 90 - 1, LKB - Produkter AB, Stockholm, die, auf passende Filterkörbe aufgezogen, in den eisswassergekühlten Extrakt eingetaucht, zur Eiweißkonzentrationserhöhung des Extraktes und gleichzeitig zur Verringerung der niedermolekularen Substanzen führten. Zur Beschleunigung der Dialyse schlossen wir sie an das Vakuum einer Wasser-

strahlpumpe an. Nach 10 Stunden hatten wir einen Eiweißgehalt des Konzentrates von 3 - 4 g/100ml. Das Dialysat wies danach eine fleischfarbene Tönung auf, das zeigte an, daß ein Teil des Myoglobins und der Proteine die Membranschranke mit der Ausschlußgrenze von Mol. Gew. 30 000 noch passiert hatte.

Das Ultrafiltrat wurde gefriergetrocknet, das Proteinkonzentrat zur weiteren Bearbeitung in kleineren Portionen eingefroren.

c. Gewinnung der Fraktionen

Durch eine kontinuierliche trägerfreie Elektrophorese erreichte NOWY (34) eine grobe Trennung und Anreicherung der Proteinkomponenten des Menschenherzens. Es wurde hierbei eine größere Menge uneinheitlicher Fraktionen hergestellt, die dann weiter mittels der präparativen Papierelektrophorese gereinigt wurden. Dadurch ergaben sich dann am Ende 10 - 11 Fraktionen.

Die Bezeichnung der elektrophoretischen Komponenten wurde willkürlich nach ihrer Mobilität mit E_1 - E_{11} vorgenommen, wobei E_1 am weitesten anodisch wandert. Die nur schwach ausgebildete Komponente E_9 konnte nicht isoliert werden.

Durch die vorbereitenden Arbeitsgänge mittels der Elektrophorese kam es zu starker Verdünnung der Fraktionen. Diese mußten, wollte man sie weiter verarbeiten, wieder auf einen Eiweißgehalt von 0,5 - 2 g/100ml gebracht werden. Mittels Carbowax (Polyäthylenglycol Typ 40 000, Serva Heidelberg) in Dialysierschläuchen von verschiedener

Größe und in mehreren Stufen konnte das bewerkstelligt werden. Dabei war strikt darauf zu achten, daß kein Carbowax außen an den Schläuchen hängen blieb, dieses hätte später zu einer Verklebung der Gelschicht geführt.

Die Einengung bis auf ca. 100 Mikroliter erfolgte im Kühlschrank. Dort wurden die Fraktionen auch bis zur weiteren Verwendung eingefroren aufbewahrt.

ERGEBNISSE

a. Eichung

(Die Eichung wurde gemeinsam mit A. Nobis, Dissertation München 1974 erstellt.)

Als Eichproteine verwendeten wir:

	MG
Myoglobin	17 800
Chymotrypsinogen A	25 000
Albumin Ei	45 000
Albumin Pferd	67 000
Albumin Mensch	69 000
Aldolase	147 000
γ -Globulin	160 000

Die Eichproteine stammten von Serva Entwicklungslabor Heidelberg und Boehringer, Calibration Kit 15967 KEAB.

Die Molekulargewichte der Eichproteine liegen bei richtigem Arbeiten auf einer Geraden. Dazu müssen Bezugssubstanzen (Eichsubstanzen) gewählt werden, die gleiche Struktur und Dichte aufweisen, wie die zu bestimmenden Macromoleküle, da jede Stoffklasse von Macromolekülen eine andere Beziehung zwischen Molekulargewicht und Elutionsvolumen finden läßt.

Zur Molekulargewichtsbestimmung der Myocardproteine des Menschenherzens wurden die Chromatographiegeräte unter identischen Bedingungen mehrere Tage lang geeicht. Wir

wiederholten diese Serien vier Mal. Auf Grund eigener Beobachtungen ließen wir Cytochrom C MG 13 000 und Katalase MG 230 000 heraus. Ebenfalls liegt γ -Globulin nicht genau auf der Geraden. Die Gründe dafür werde ich später in der Diskussion erläutern.

Mit diesem Wicksatz lassen sich Molekulargewichtsbestimmungen von 18 000 bis 300 000 durchführen.

TABELLE 1

		MG
Eichproteine	a: Myoglobin	17 800
	b: Chymotrypsinogen A	25 000
	c: Albumin Ei	45 000
	d: Albumin Pferd	67 000
	e: Albumin Mensch	69 000
	f: Aldolase	147 000
	g: γ -Globulin	160 000

Alle Abläufe der Proteine beziehen sich auf Myoglobin und sind Mittelwerte aus 6 - 8 Abläufen.

Versuchsserie	a	b	c	d
I	1,0	1,0908	1,3156	---
II	1,0	1,1109	1,2935	---
III	1,0	1,1111	1,28	---
IV	1,0	1,114	1,2604	1,4543

versuchsserie	e	f	g
I	1,5053	1,7887	1,8702
II	1,4875	1,751	1,905
III	---	1,746	1,857
IV	1,469	1,740	1,826

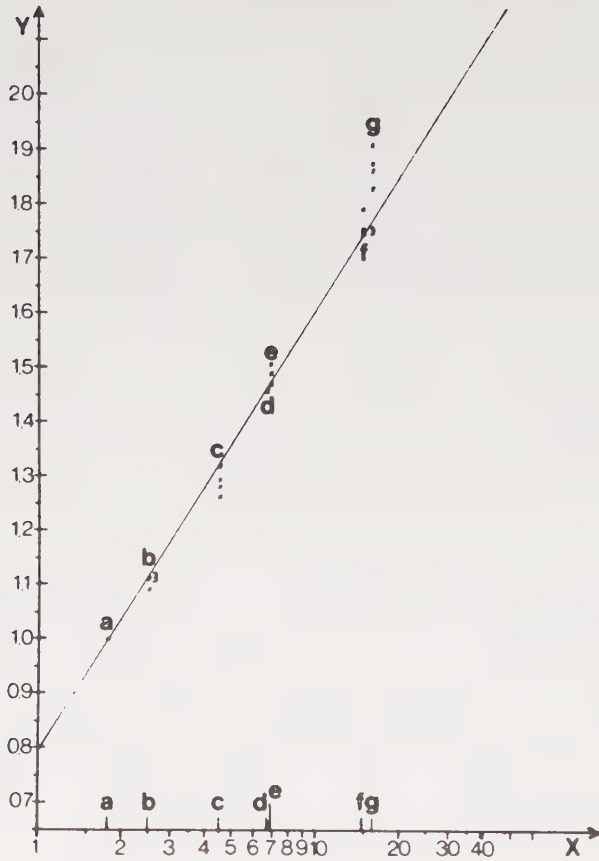


Abb 3: Eichkurve

X -Koordinate: Molekulargewicht $\times 10\,000$

Y -Koordinate: Entfernung des Proteins A zum Startpunkt
 Entfernung des Lyocoglobins zum Startpunkt

Testproteine:

a= Lyocglobin; b= Chymotrypsinogen; c= Albumin Ei;

d= Albumin Pferd; e= Albumin Mensch; f= Aldolase;

g= γ -Globulin.

b Molekulargewichtsschätzungen

FRAKTION E₁ : Die Fraktion zeigt ein stark gefärbtes Oval mit einem zweiteiligen Schweif. aus der starken Anfärbung läßt sich ein Molekulargewicht von 69 500 ermitteln. Der Schweif endet bei einem $\bar{M}_n$ von ca. 142 400.

FRAKTION E₁₊₂ : Bei dieser Mischfraktion ist der doppelte Schweif wesentlich starker ausgeprägt als bei der Fraktion E₁. Als Molekulargewicht ließ sich ermitteln: Hauptbestandteil bei $\bar{M}_n$ 31 900 und $\bar{M}_n$ 157 000.

FRAKTION E₂₊₁ : Hier überwiegt wohl in der Konzentration E₂ ; denn es ist nur ein Fleck mit allerdings sehr langem schwachen Schweif zu sehen.
 $\bar{M}_n$ 61 400.

FRAKTION E₂ : Weist nur einen sehr schwachen Flecken auf.
 $\bar{M}_n$ 84 000.

FRAKTION E₃ : Ist etwas deutlicher zu sehen als E₂, hat auch wieder einen schwachen Schweif. $\bar{M}_n$ 112 500.

FRAKTION E_{3b} : Setzt sich wahrscheinlich aus vier Komponenten zusammen, da es in einem schwachen Schweif vier deutlich starker gefärbte Bezirke gibt. (Hauptflecken sind unterstrichen)

$\bar{M}_n$ 13 800

$\bar{M}_n$ 30 500

$\bar{M}_n$ 68 000

$\bar{M}_n$ 325 000

FRAKTION E_{3b}¹: Ist eine besser gereinigte Fraktion zu E_{3b}; zeigt vom Ablauf und der Aufteilung der Flecken wenig Unterschied zu der oben beschriebenen.

MG 13 700

MG 26 500

MG 54 000

MG 257 000

FRAKTION E_{4ab}: Als einzig deutlich in dem Schweiß bildet sich ein Flecken ab, bei MG 79 000. Alle anderen Flecken waren zu schwach für eine einigermaßen genaue Bestimmung.

FRAKTION E_{4b}: Zeigte nur einen sehr schwachen Flecken, dessen Molekulargewicht bei ca. 62 000 liegen dürfte.

FRAKTION E₅: Zeigt zwei durch einen Schweiß verbundene Flecken. Der deutlichere Flecken liegt bei MG 19 000 und der weniger ausgeprägte bei MG 52 800.

FRAKTION E₇₊₈: Besteht wahrscheinlich aus vier Komponenten, wobei die am deutlichsten ausgeprägte Komponente die Form wie die Fraktion E₁ hat. Alle vier Komponenten gehen ineinander über. MG ca. 120 000.

FRAKTION E₈: Zeigt einen mäßig angefarbten Flecken, der ein MG von ca. 65 000 ergibt.

FRAKTION E₁₀: Besteht aus einem kaum sichtbaren Flecken und ergibt ein MG von 65 000.

FRAKTION E₁₁: Ist ebenfalls kaum auszumachen. Wahrscheinliches MG 55 000.

FRAKTION E₇₋₁₁: Zeigt drei Komponenten von unterschiedlich starker Anfärbung.

EG 14 500

EG 44 500

EG 148 000

FRAKTION E₈₊₉: Ist sehr schwer zu sehen, ein Fleck tritt deutlich heraus, es bestehen aber wahrscheinlich daneben noch vier weitere. EG 70 000.

FRAKTION E₉₊₁₀: Die Flecken sind nur zu ahnen. Für eine Auswertung nicht zu gebrauchen.

Bei den großen Fehlermöglichkeiten unseres Systems, möchte ich lieber von Molekulargewichtsschätzungen als Molekulargewichtsbestimmungen sprechen. Die Molekulargrößen haben relativ große Schwankungsbereiche, besonders dann, wenn es sich um Mischfraktionen handelt.

Die dazu führenden Gründe möchte ich später in der Diskussion besprechen. Für die Versuche standen uns zum Teil einheitliche elektrophoretische Komponenten zur Verfügung, andere enthielten Beimengungen benachbarter Komponenten.

TABELLE 2: ZUSAMMENFASSENDE TABELLE
(Die Hauptbestandteile sind bei den Mischfraktionen
unterstrichen)

Fraktion	MG
E 1	69 500
E 1+2	<u>31 900</u>
	157 000
E 2+1	61 400
E 3	84 000
E 3!	112 500
E 3b	13 800
	<u>30 500</u>
	<u>68 000</u>
	325 000
E 3b!	13 700
	<u>26 500</u>
	<u>54 000</u>
	257 000
E 4ab	<u>79 000</u>
E 4b	62 000
E 5	<u>19 000</u>
	52 800
E 7+8	<u>120 000</u>
E 8	65 000
E 10	65 000
E 11	55 000
E 7-11	14 500
	44 500
	148 000
E 8+9	70 000

DISKUSSION

A DISKUSSION DER METHODIK

a Aufbereitung des Materials

Kein Verlust der Löslichkeit der Proteine tritt nach MACKENZIE und LUIET (26) bei langsamer Erwärmung des gefriergetrockneten Gewebes auf Zimmertemperatur ein. Um einer Proteindenaturierung durch Oxidation von SH-Gruppen zuvorzukommen, fordert POEL (37) eine möglichst kurze Homogenisierungszeit des Muskelgewebes. Nach STERN und BIRD (41) hielten auch wir uns an eine Arbeitsspanne von 2 Minuten. Auch nach zweimonatiger Lagerdauer bei -20°C oder durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen beobachteten BAUER und Mit. (7) keine Änderung der Pherogramme von Muskelextrakten. Während unserer Versuchsabläufe, die sich über längere Zeit hinstreckten, wobei die Herzmuskelextrakte häufiger aufgetaut und eingefroren wurden, konnten wir keine qualitative Änderung der Proteinzusammensetzung mit Sicherheit erkennen.

In unserem Herzmuskelextrakt ist, auf Grund des Autopsiematerials, mit Beimengungen von Serumweiß und Haemoglobin zu rechnen. NOWY (35) umgeht diese Fehlerquelle im Tierversuch dadurch, daß er das noch schlagende Herz beim Kaninchen in corpore mit vorgewärmter Ringerlösung solange durchspült, bis es vom Blut ausgewaschen ist. BAUER und Lit. (7) untersuchen die Pherogramme von blutiger und ausgebluteter Muskulatur. Es stellen sich außer in der Albuminfraktion keine Differenzen heraus. WINTERBOTTOL und KRONMANN (46) untersuchten die Extrahierbarkeit wasserlöslicher Proteine an Rindermuskel. Dabei stellten sie nach 7-tägiger Lager-

ung bei 3° C bzw. nach 5 -wöchiger Lagerung bei -20° C deutlich eine Abnahme der Extrahierbarkeit fest. Ferner sieht man eine Zunahme der Proteine mit niederem Molekulargewicht bei gleichzeitiger Abnahme der Proteine mit höherem Molekulargewicht bei einem Vergleich der Sedimentationsdiagramme bei Extrakten von "gefrorener" und "gealterter" Muskulatur, gegenüber frischer Muskulatur.

b. Versuchsdurchführung

Die Dünnschicht - Gel - Chromatographie ist heute noch eine wenig benutzte Methode zur Bestimmung von Proteinen. Wie sich während unserer Versuche zeigte, ist sie aber neben den weitaus aufwendigeren Methoden eine gute Lösung um einen schnellen Überblick über die Molekulargewichte von Proteinen zu erhalten. Dazu kommt man bei dieser Methode mit sehr geringen Probemengen aus. Verschiedene Autoren zeigen aber, daß diese Methode viele Fehlerquellen beinhaltet, die einmal durch das Material, zum anderen in der Durchführung liegen können. Unterschiedliche Meinungen herrschen über die Aufbereitung des Gels. DETERMANN (12) bereitet das Gel durch 5 -ständiges Sieden im Wasserbad auf, eine andere Methode wird von DETERMANN (12) und RADOLA (39) beschrieben, die das Gel 2 - 3 Tage im Überschuß quellen lassen und dann abdekantieren. JOHANSON, BENNETT und KYLO (22) und MORRIS (31) gebrauchen eine dicke Suspension, die bei der Aufbereitung des Gels mit wenig Lösungsmittel entsteht. Das Gel selbst wird mit einem Glasstab aufgestrichen, was unserer Meinung nach eine ungleichmäßige Schicht ergibt, wir gebrauchten

deshalb ein Streichgerät der Firma Boehringer, Mannheim, das uns eine gleichmäßige Schichtdicke von 0,5 mm lieferte.

Auch bei dem Gebrauch der fertig beschichteten Platten herrschten Unterschiede. Am Weitesten ging RADOLA (39), der die Platten über Nacht unter versuchsbedingungen vor-
äquiliibriert. DETERMANN und MATTNER (13) lagern die beschichteten Platten in einer mit feuchtem Filterpapier ausgekleideten Kammer für 12 Stunden bis zu 8 Tagen. DETERMANN (12) gebraucht aber auch in einigen Fällen die Platten sofort nach dem Beschichten. Mit dieser Methode haben wir die besten Erfolge erzielt, da in der feuchten Kammer die Platten doch am Rand etwas austrockneten und dadurch einen starken Randeffect zeigten.

Weiter gebrauchten die Autoren unterschiedliche Ablaufwinkel, Ablaufzeiten und Bezugsproteine. DETERMANN und MATTNER (13) benutzten einen Winkel von $15 - 30^{\circ}$ und lassen ihr Cytochrom C 2cm pro Stunde laufen. RADOLA (39) fordert einen Winkel von $10 - 15^{\circ}$ und eine Wanderungsgeschwindigkeit des Myoglobins von 1cm pro Stunde. Eingestellt wird diese Wanderungsgeschwindigkeit durch die Höhe des Elutionsmittelspiegels.

Wir ließen unser Myoglobin bei einem Winkel von 30° und 1,5 cm pro Stunde ablaufen, und kamen auf eine Ablaufzeit von 4 - 5 Stunden. Unterschiedliche Ablaufzeiten ergaben sich durch wechselnde Außentemperaturen, was auch WHITAKER (42) und LEACH u. O'SHEA (26) in ihren Arbeiten beschrieben.

Ferner beobachteten wir, ebenso wie es RADOLA (39) es beschrieben hat, geringfügige Veränderungen im Ablauf und den R_{LyO} -Werten, je nach Konzentration und Auftragsvolumen der Proteinlösung.

Allein beim Abklatsch waren sich alle Autoren so ziemlich einig, daß das Trocknen nicht auf der Platte vorgenommen werden sollte, da sich dabei Verschiebungen, speziell am Rand einstellten (MORRIS 31). So wurden die Abklatsche nach Abnahme entweder im Heißluftschrank bei 110°C , bei feuchter Hitze um 110°C oder unter einem Föhn, jeweils in waagerechter Lage getrocknet.

Das Anfärben brachte wieder Uneinigkeit. Es werden Methoden mit Amido Schwarz oder Comassie Brilliant Blau beschrieben, ferner Besprühen mit Pauly'schen Reagenz und nachherigem Sichtbarmachen mit UV-Licht (DETERMANN 12). Auch besteht die Möglichkeit den Proteinen Fluorescein-isothiocyanat beizusetzen, wonach sie sich im UV-Licht während ihrer Wanderung gut erkennen lassen. Der Nachteil dabei ist nur, daß das zu einer Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit führt.

Eines der zentralen Probleme bildet dann zum Abschluß das Auswerten der Abläufe. Außer RADOLA (39) kreisten alle anderen Autoren die Flecken mit einem Bleistiftstrich ein und maßen die Entfernung zu dem Startpunkt. RADOLA benutzte einen Integral-Dichtemesser. Er trägt die Flecken dafür jedoch nicht mit der Mikrospritze auf, sondern als Rechteck mit einem Mikroskopierdeckglas. Auch wir haben solche Versuche unternommen, sie scheiterten jedoch, da der Fehler durch das dicke Abklatschpapier mit dem daraufhaftenden Gel zu groß war. Deshalb entschieden wir uns wieder für das Umkreisen mit dem Bleistift.

c. Proteinverhalten im Versuch

In seinen Versuchen findet RADOLA (39), daß Ferritin, Urease und Fibrinogen nicht auf die Gerade der $R_{t, \text{yo}}$ -Werte der Molekulargewichte paßt, sondern auf die Gerade der Stokes'schen Radii. Bei Gebrauch des Sephadex zur Bestimmung der Proteine fordert SIEGEL und MONTY (40) den $R_{t, \text{yo}}$ -Wert nicht vom Molekulargewicht sondern nur vom Stokes'schen Radius abhängig zu machen. ACKERS 1, ANDREWS 3,4, DETERMANN 12, WHITAKER 42 sind der Meinung, daß zum genauen Herausfinden der Molekulargewichte sowohl der $R_{t, \text{yo}}$ -Wert der Molekulargewichte, als auch der Stokes'schen Radius nötig sind.

ANDREWS (3,4), DETERMANN (12,15) und WHITAKER (42) fanden mit beiden Methoden gute Ergebnisse bei der Bestimmung von globulär^{en} und kohlehydratfreien Proteinen. während kohlehydratreiche Proteine sowohl bei der Säulengelfiltration, als auch bei der Dünnschicht - Gel - Chromatographie nicht auf der Geraden lagen. ANDREWS (4,5) und RADOLA (39) zeigen, daß Fibrinogen und Apoferritin nicht auf der Geraden liegen, daß Ovalbumin sich manchmal unterschiedlich verhält. Bei γ -Globulin wird ein Molekulargewicht von 200 000 gegenüber 160 000 gefunden. So täuscht auch Cytochrom C ein wesentlich höheres Molekulargewicht vor (LEACH und O'SHEA 26), weshalb wir es nicht als Bezugsprotein heranzogen. Mit einem Molekulargewicht von 35 600, etwa der Hälfte, fällt Haemoglobin sowohl bei der Dünnschicht - Gel - Chromatographie als auch bei der Säulengelfiltration (ANDREWS 3, WHITAKER 42) heraus.

Mit Vorteil läßt sich die Dünnschicht - Gel - Chromatographie dort anwenden, wo die Säulengelfiltration ihre Grenzen aufweist, z.B. bei geringem Unterschied der wirk-

samen Molekülradien. Dieses Problem kann nur durch sehr lange Säulen gelöst werden. Sehr lange Säulen zeigen aber eine Deformation der Gelpartikel und damit keinen Durchfluß der Proteine mehr (JAWOREK 21), während lange Platten diesen Fehler nicht aufweisen.

B DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Bei der Einteilung der Fraktionen hielten wir uns an NOWY (34), der die Proteine der Elektrophorese (Auftrennung auf Celluloseacetat-Folie in Tris - EDTA - Borsäurepuffer pH 8,9) in mehrere Komponenten aufteilte. Er bezeichnete das am meisten zur Anode wandernde Myoalbumin als Fraktion 1 und das Myoglobin, das schon ohne Anfärbung als rotbrauner Streifen sichtbar ist, als Fraktion 6. So erhielt er 10 - 11 Fraktionen.

Andere Autoren wie z.B. DUBUISSON (16) unterteilte nur in 3 Hauptgruppen oder stellten sie zu den Serumproteinen in Beziehung.

Auch durch verschiedene Gele können sich andere Ergebnisse herausstellen. So ist eine Linearität für Sephadex G 200 superfine nur in einem Bereich von Molekulargewicht 10 000 bis 240 000 zu finden. Für weniger hohe Molekulargewichte eignet sich besser G 75 bzw. 7 100. RADOLA (39) weist nach, daß bei dem von uns gebrauchten Gel, Sephadex G 200 superfine, eine Fehlerbreite von $\pm 10\%$ einzubeziehen ist.

Die Dünnschicht - Gel - Chromatographieabläufe lassen sich bei gleicher Bearbeitungsweise leicht reproduzieren und vergleichen. Die Fraktion E_1 erschien fast einheitlich und scheint dem Myoalbumin zu entsprechen. BATE-SMITH (6) hat es bereits 1937 beschrieben und eine Ähnlichkeit mit Serumalbumin ist nicht zu verleugnen. NOWY (33) und BAUER (7) bestätigen ebenfalls durch ihre Versuche eine Identität zwischen Myoalbumin und Serumalbumin.

Die Fraktion E_2 , ein von NOWY (34) mit LG 81 000 und M_n über 600 000 angegeben, erscheint bei uns mit einem Schweif bei ca. 19 000 (sehr schwach), einem Hauptfleckchen bei 61 400, entspricht etwa dem Myoglobin, und einem langem dünnen Schweif, der etwa bei 800 000 endet (= Aus-

schlußgrenze des Sephadex $\bar{A}$ 200 superfine).

Die Fraktion E_3 erscheint nur sehr schwach, ebenso $E_{3!}$. E_{3b} und $E_{3b!}$ dagegen weisen jeweils vier Bestandteile auf, wobei wie bei allen E_3 -Fraktionen eine dem γ -Albumin zugeordnet werden könnte.

Die Fraktion E_{4ab} weist mit Sicherheit zwei Komponenten bzw. drei Komponenten auf, von denen eine mit Myoglobin identisch ist. Bei E_{4b} ließe sich der Fleck, der sich herausstellt, mit dem MG von 62 000, wiederum mit γ -Albumin vergleichen.

Die Fraktion E_5 besteht aus zwei Komponenten, von denen die eine ein MG etwa vergleichbar dem des Myoglobins aufweist.

Alle anderen Einzelfraktionen, E_8 und E_{10} , bestehen wieder nur aus je einem Fleck, deren Molekulargewichte bei 65 000 und 55 000 liegen.

Alle anderen weiteren Fraktionen mußten wir aus Mischfraktionen entnehmen, von denen wir nicht die prozentuale Zusammensetzung und die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile kannten, und die, wie vorher schon beschrieben, sicherlich nicht ganz richtig und exakt vergleichbar sind, mit Molekulargewichten, die auf eine andere Weise aus Einzelfraktionen bestimmt wurden.

Sehr viele Ergebnisse brachten die Molekulargewichtsbestimmungen durch die Säulengelfiltration. Die Autoren ANDREWS 3, DETERMANN und MICHEL 14,15, und MORRIS 31 kamen bei vergleichenden Untersuchungen zwischen Gelfiltration und Dünnschicht - Gel - Chromatographie zu guten Übereinstimmungen bei globulären Proteinen.

Zu ähnlichen Molekulargewichten wie wir kommt MEISTER (30) durch die Säulengelfiltration.

TABELLE 3: ZUSAMMENFASSENDE TABELLE

Fraktion	MG durch Dünnschicht-Tech.	MG durch Säulenchromat.
E 1	69 500	67 000
E 1+2	<u>31 900</u>	35 000
	157 000	125 000
E 2+1	61 400	70 000
E 3	84 000	70 000
E 3!	112 500	120 000
E 3b	13 800	---
	<u>30 500</u>	30 000
	68 000	70 000
	325 000	---
E 3b!	13 700	
	<u>26 500</u>	
	<u>54 000</u>	
	257 000	
E 4ab	79 000	85 000
E 4b	62 000	
E 5	<u>19 000</u>	20 000
	52 800	60 000
E 7+8	<u>120 000</u>	135 000
E 8	65 000	70 000
E 10	65 000	70 000
E 11	55 000	70 000
E 7-11	14 500	27 000
	<u>44 500</u>	70 000
	148 000	135 000
E 8+9	70 000	

Dem Identitätsnachweis von Serum- und Muskelproteinen sind Grenzen gesetzt, da einzelne Komponenten, wie z.B. Serum- und Muskelalbumin sogar immunologisch verwandt sind. Außerdem wird auch das Vorhandensein von Serumweiß im Interzellularraum diskutiert.

Die Pherogramme unserer zwei Herzmuskelextrakte ergaben nur ganz geringe Abweichungen. Auch GROUCHY und ROUBIN (18) bemerkten keine nennenswerten Differenzen im Proteinmuster gleicher Organe.

Eindrucksvolle Unterschiede ergaben sich dagegen im Vergleich von Skelett- und Herzmuskelextrakten derselben Spezies. NOWY (33) stellte einen verschwindend geringen Lyoalbuminanteil des Skelettmuskels gegenüber dem Herzmuskel fest, sogar bei ein und demselben Spezies ergaben sich Unterschiede zwischen linkem und rechten Vorhof und Ventrikel. Diese Unterschiede haben wohl in erster Linie funktionelle Bedeutung; deshalb ergeben sich bei der Ausstattung der Organe mit Enzymen, Transport- und Reserveproteinen derartige Abweichungen.

Bei einem Vergleich der Molekulargewichte der Proteine des Menschenherzens mit denen des Kalbsherzens, nach einer Untersuchung von A. MORIS (32), scheinen die Fraktionen E_1 bis E_3 und E_5 identisch zu sein, alle anderen Fraktionen differieren dagegen sehr stark. (Siehe Tabelle 4)

Ein solcher Vergleich wird auch dadurch erschwert, daß sich Pherogramme menschlicher und tierischer Herzextrakte in mehreren Komponenten unterscheiden (MEISTER G., 30).

TABELLE 4: VERGLEICHENDE TABELLE
MENSCH- : KALBSEXTRAKT

Fraktion	Mensch	Kalb
E 1	69 500	64 000
E 2	61 400	62 000
		(18 000) ?
	112 500	113 000
E 4		17 500
	79 000	47 500
E 5	19 000	17 000
		26 800
		60 000
E 6	---	13 000
		18 000
		64 000
E 7		(16 000) ?
	120 000	62 000
E 8		23 500
	65 000	53 000
E 9	---	13 400
		60 000
E 10	65 000	---
E 11	55 000	---

Je nach Ionenstärke der verwendeten Lösungen ändert sich die Eiweißzusammensetzung bei der Extraktion. Dieser Vorgang tritt nicht langsam ein, sondern ändert sich unter verschiedenen Ionenstärken plötzlich (BOSCH 9). Zu Proteinen des Sarkoplasmas gelangt man bei der Extraktion mit Lösungen schwacher Ionenstärke. Da NOWY (33) zur Gewinnung von kontraktilen Fraktionen eine Ionenstärke von mindestens 0,35 fordert, extrahierten wir mit destilliertem Wasser und gelangten so, mit einiger Sicherheit zu nicht kontraktilen Sarkoplasmaeiweiß. Muskelhomogenate und Muskelpreßsäfte wurden von AMBERSON und Mit. (2) untersucht. Sie stellten dabei fest, daß die Homogenate doppelte Enzymaktivitäten enthalten. Ferner wird durch Homogenisieren sowohl die cytoplasmatische, als auch die strukturgebundene GOT freigesetzt (BORST und PEETERS 8). Zur Trennung von Sarkosomen und Zellstrukturen braucht man eine Beschleunigung von 33 000 g, zur Abtrennung der Mikrofraktionen 105 000 g (HULSMANS 20).

Die Proteine des Sarkoplasmas bestehen zu einem wesentlichen Prozentsatz aus Enzymen. Durch pathologische Vorgänge, die zu Gewebsläsionen führen, können Fermente freigesetzt werden, die sich dann im Serum nachweisen lassen. Häufig ist eine eindeutige Organdiagnose erwünscht, die sich aber durch die Messung der Gesamtaktivitäten nicht stellen läßt, hier hilft oftmals das Isoenzymmuster der Organextrakte weiter. Dabei fand WIEBE (43) im Serum von Myocardinfarktpatienten eine Erhöhung der am meisten anodisch wandernden LDH-Fraktion I und II, während Hepatitis eine Zunahme der kathodischen Fraktionen und Karzinome und Leukämien einen Anstieg aller LDH-Isoenzyme erkennen ließ (WROBLEWSKY F. 44).

Hohen diagnostischen Wert besitzt die gleichzeitige Darstellung von LDH, GOT und MDH-Isoenzymen (KAMARYT und SAZVORKA 23). Soweit wir informiert sind, sind absolut herzspezifische Fermentnachweise bislang nicht gefunden worden.

Weitere Untersuchungen über die Proteinzusammensetzung des menschlichen Myocards und die Verteilung der Isoenzyme im Pherogramm, vergleichbar den Untersuchungen von HAMBURGER und MITTELBACH (28,29) am Skelettmuskel, könnten weitere wichtige Informationen liefern.

Eine bessere Einteilung und Bestimmung wäre möglich, durch eine Isolation und Reindarstellung der Einzelkomponenten der Proben. Für eine exakte Molekulargewichtsbestimmung ist sie jedoch auf Grund der vorher besprochenen Fehlermöglichkeiten nicht optimal verwertbar, zumal die zu untersuchenden Proteine unbekannt sind und wir nicht wissen, ob sie globulär oder kohlehydratreich sind, daneben kennen wir weder ihre Konzentration noch ihre Stoke'schen Radii.

ZUSAMMENFASSUNG

Die löslichen nicht kontraktilen Proteine aus zwei menschlichen Herzen wurden durch Elektrophorese und anschließender Dünnschicht - Gel - Chromatographie in ihre einzelnen Komponenten zerlegt und die Molekulargewichte mit Hilfe bekannter Bezugsproteine anhand der R_{Myo} -werte geschätzt. Dabei ergaben sich die Molekulargewichte von 26 Eiweißkomponenten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ACKERS, G.K.:
Molecular Exclusion and Restricted Diffusion Processes
in Molecular-Sieve Chromatography.
Biochemistry, 3 (1964) 723
2. AMBERSON, A., VERGANI, C., LOMANTO, B.:
The Attachment of Glycolytic Enzymes to Muscle Ultra-
structure.
J. Cell. and Comp. Physiol., 66 (1965) 71
3. ANDREWS, P.:
Estimation of the molecular weights of proteins by
Sephadex gel filtration.
Biochem. J., 91 (1964) 222
4. ANDREWS, P.:
The Gel Filtration Behaviour of Proteins related to
their Molecular Weights over a wide Range.
Biochem. J., 96 (1965) 595
5. ANDREWS, P., IN PEETERS, H.:
(Editor), Protides of the Biological Fluids.
Vol. 14, Proceedings of the Fourteenth Colloquium,
Bruges, 1966, Elsevier, Amsterdam, 1967, p.573
6. BATE-SMITH, E.C.:
Proc. roy. Soc. Med., 124 (1937) 136

7. BAUER, H., GLÖTZNER, F., SCHWARZE, I., SCHMALBACH, K.:
Elektrophoretische und immuno-elektrophor. Studien über
Muskelproteine
Klin.Wschr., 42 (1964) 1198
8. BORST, P., PEETERS, E.M.:
The Intracellular Localisation of Glutamate-Oxalacetat
Transaminase in Heart.
Biochim.Biophys.Acta, 54 (1961) 188
9. BOSCH, M.W.:
Quantitative Electrophoretic Study of Rabbit Muscle
proteins Soluble in Dilute Salt Solutions
Biochim.Biophys.Acta, 7 (New York 1951) 61
10. CARNEGIE, P.R., PACHECO, G.:
A Combination of Chromatography and immuno-diffusion
on a micro-scale.
Proc.Soc.exptl.Biol.Med., 117 (1964) 137
11. CREPAN, P.:
Etude Elektrophortique de d'extraits de muscle Doues
de Differentes Proprietees Morphologiques de
Fonctionelles.
Biochim.Biophys.Acta, 9 (1952) 385
12. DETERMANN, H. u. MICHEL, W.:
Gelchromatographie - Ein Lehrbuch u. Laboratoriumsbuch
(Springer 1967)

13. DETERMANN, H., MATTNER, U.:
Gelchromatography as a Means for Differentiation
between Dehydrogenases
FEBS Letters, 2 (1969) 163
14. DETERMANN, H. u. MICHEL, W.:
Neuere Entwicklung bei der dünn-schicht-chromatograph-
ischen Trennung von Proteinen.
Z. ANAL. Chem. (1965) 211-212
15. DETERMANN, H. u. MICHEL, W.:
The Correlation between Molecular weight and Elution
Behaviour in the Chromatography of Proteins
J. Chromatog., 25 (1966) 303
16. DUBUISSON, M.:
Modification dans la structure physiochimique de
l'edifice contractile au cours du cycle de la
contraction musculaire.
Biochim. Biophys. Acta, 4 (1950) 25
17. FRANT, G. H., EVERALL, J.:
Gel immunofiltration. A new Technique for the
qualitative analysis of serum proteins.
J. of Clinical Pathology 18 (1965) 654-659
18. GREGORY, J. de, MORIN, E.:
Proteines et Enzymes Tissulaires - Une Etude par
Electrophorese en Gel d'Amidon
Rev. franc. Et. clin. biol. 5 (1960) 286

19. HANSON, L.A., JOHANSON, B. J., RYMO, L.:
Further Applications of thin-layer gel filtration
Two dimensional gel filtration-electrophoresis and
immuno-gel filtration
Clinica chimica Acta 14 (1966) 391-398
20. HULSMANS, H.A.M.:
Microsomes in Heart Muscle Homogenates
Biochim.Biophys.Acta 54 (1961) 1
21. JAWOREK, D.:
Dünnschichtelektrophorese Teil 1 :
Ein neues Gerät zur Dünnschicht - Gelchromatographie
Boehringer Mannheim GmbH Tutzing 292 (1969)
22. JOHANSON, B.G., BENGT, G., RYMO, L.:
Separation of proteins by thin-layer gel filtration
Acta chem.Scand. 18 (1964) 217-223
23. KAMARYN, J., ZAZVORKA, Z.:
Die Enzymelektrophorese der Malatdehydrogenase
Clin.Chim.Acta 9 (1964) 559
24. LATHE, G.H., RUTHVEN, C.R.J.:
Biochem.J.. 62 (1956) 665
25. LAURENT, T.C., KILLANDER, J.:
A Theory of Gel Filtration and its Experimental
Verification
J.Chromatogr. 14 (1964) 317

26. LEACH, A.A., O'SHEA, P.C.:
The Determination of Protein Molecular Weights of
up to 225 000 by Gel-Filtration on a single Column
of Sephadex G 200 at 25° and 40°
J.Chromatog. 17 (1965) 245-251
27. MACKENZIE, A.P., LUYET, B.J.:
Freeze-Drying and protein Denaturation in Muscle
Tissues; Losses in Protein Solubility.
Nature 215 (1967) 83
28. MITTELBACH, F., HAMBURGER, K.:
Die Proteinfraktionen des menschlichen Skelettmuskels
in der direkten Gewebs-Disc-Elektrophorese und ihre
Zuordnung zu verschiedenen Enzymaktivitäten
Klin.Wschr. 47 (1969) 811
29. MITTELBACH, F., HAMBURGER, K.:
Vergleichende elektrophoretische Untersuchungen über
Muskelproteine bei normalen, neurogen atrophischen
und myopathisch veränderten Skelettmuskel
Klin.Wschr. 48 (1970) 212
30. MEISTER, G.:
Säulen-Gelchromatographie und Elektrophorese mensch-
licher Herzmuskelproteine mit Molekulargewichts-
schätzungen
Diss. München 1973

31. ORRIS, U. I. O. R.:
Thin-layer Chromatography of Proteins on Sephadex
T 200 and G 100
J. Chromatog. 16 (1964) 167
32. NOBIS, A.:
Molekulargewichtsschätzungen von Herzmuskelproteinen
beim Kalb mit der Dünnschicht-Gel-Chromatographie
Diss. München 1974
33. NOWY, H.:
Elektrophoretische Analysen von Herzmuskelproteinen
Mat. Med. Nordmark 17 (1965) 509
34. NOWY, H.:
Molekulargewichtsschätzungen elektrophoretischer
Komponenten von Herzmuskelproteinen.
(Nicht veröffentlicht)
35. NOWY, H., SEITZ, W.:
Elektrophoretische Untersuchungen des fixierten
Kaninchenherzens
Z. ges. exp. Med. 126 (1955) 1
36. OGSTON, A. G.:
Trans. Faraday Soc. 54 (1958) 1754
aus: The Correlation between Molecular Weight and
Elution Behaviour in The Gel Chromatography of
Proteins
J. Chromatog. 25 (1966) 303-313

37. POEL, W.E.:
Preparation of Acellular Homogenates from Muscle
Samples
Science 108 (1948) 390
38. BORATH, J., FLODIN, P.:
Gel Filtration: A Methode for Desalting and Group
Separation
NATURE 183 (1959) 1657
39. RADOLA, G.P.:
Thin-Gel Filtration of Proteins
J.Chromatog. 38 (1968) 61
40. SIEGEL, L.M., MONTY, K.J.:
Determination of Molecular Weights and Frictional
Ratios of Proteins in Impure System by use of Gel
Filtration and Density Gradient Centrifugation.
Application to crude Preparations of Sulfite and
Hydroxylamine Reductases.
Biochim.Biophys.Acta 112 (1966) 346
41. STERN, R., RITO, G.M.:
The use of waring Blender in Biochemical Work
Biochem.J. 44 (1949) 635
42. WHITAKER, J.R.:
Determination of Molecular Weights of Proteins by
Gel Filtration on Sephadex
Anal.Chem. 35 (1963) 1950

43. WIEME, R.J.:
Application Diagnostique de l'Enzyme-Electro-
phorese des Dehydrogenase de l'Acide Lactique.
Clin.Chim.Acta 4 (1959) 46
44. WROBLEWSKY, F.:
Diagnostic Dissection by Isoenzymes. Pure appl.
Chem 3 (1961) 385
45. JOHANSON, B.G., RYMO, L.:
Thin-layer Gel Filtration
Acta chem.Scand. 16 (1962) 2067-2068
46. WINTERBOTTOM, R.J., KRONMANN, M.T.:
Post Mortem Changes in the Water Soluble Proteins
of Bovine Skeletal Muscle During Aging and Freezing
J.agric.Food Chem 8 (1960) 67

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Nowy für die freundliche Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Ferner gilt auch mein Dank Frau Krülle, die mich bei verschiedenen technischen Arbeiten unterstützte.

Ebenso danke ich meinem Mann für die Hilfe während der Versuchsdurchführung.

LEBENS LAUF

Am 10. März 1948 wurde ich als erste Tochter des Elektro-, Rundfunk- und Fernsehtechnikermeisters Alwin Dähnke und dessen Ehefrau Hedwig, geb. Degen, in Quakenbrück geboren.

In meiner Heimatstadt besuchte ich die Volksschule, wechselte dann 1958 zur Mittelschule und ein Jahr später zum Artland-Gymnasium über, wo ich im September 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Noch im WS 1966/67 begann ich in Bonn das Zahnmedizinstudium und bestand auch dort an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität im März 1970 die zahnärztliche Vorprüfung.

Zum WS 1970/71 tauschte ich meinen Studienplatz in Bonn gegen einen Platz in München ein. Hier legte ich dann am 12. Dezember 1972 die zahnärztliche Prüfung ab. Am 3. Januar 1973 erteilte mir das Bayerische Staatsministerium des Innern die Bestallung als Zahnärztin.

Seit dem 1. Januar 1973 bin ich als Assistent an der Zahnklinik der Universität München in der prothetischen Abteilung bei Prof. Dr. E. Kraft angestellt.

Am 24. April 1973 heiratete ich meinen Kollegen Axel Nobis in Quakenbrück.

